

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
PARIS

(11) N° de publication :  
(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)

2 611 742

(21) N° d'enregistrement national :

87 02767

(51) Int Cl<sup>4</sup> : C 12 N 1/00; C 12 M 1/36; C 02 F 3/34.

(12)

## DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

(22) Date de dépôt : 2 mars 1987.

(30) Priorité :

(43) Date de la mise à disposition du public de la  
demande : BOPI « Brevets » n° 36 du 9 septembre 1988.

(60) Références à d'autres documents nationaux appa-  
rentés :

(71) Demandeur(s) : Société dite : LYONNAISE DES EAUX.  
— FR.

(72) Inventeur(s) : Alain Huyard; Agnès Millot; Jean-Marc  
Audic; Gérard Faup.

(73) Titulaire(s) :

(74) Mandataire(s) : Cabinet Ores.

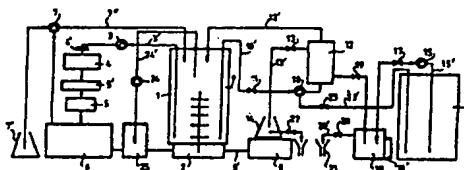
(54) Procédé de production de cultures enrichies en microorganismes et/ou en métabolites résultant de ces cultures, appareillage pour la mise en œuvre de ce procédé et application de ce dernier, notamment à l'ensemencement et au réensemencement des nitrificateurs et bassins de traitement des eaux.

(57) La présente invention concerne un procédé de production de cultures enrichies en microorganismes et/ou en métabolites résultant de ces cultures.

Selon ce procédé, on cultive des souches de microorganismes sélectionnées, dans un bioréacteur, en présence d'un substrat dont la concentration est maintenue à des valeurs non-inhibitrices de la croissance des bactéries, on élimine du milieu de culture les produits susceptibles d'inhiber les cellules, et on récupère les microorganismes et/ou les métabolites.

L'invention concerne également un appareillage pour la mise en œuvre de ce procédé.

Application de ce procédé notamment à l'ensemencement et au réensemencement des nitrificateurs et bassins de traitement des eaux.



FR 2 611 742 - A1

D

- 1 -

La présente invention est relative à un procédé de production de cultures enrichies en microorganismes et/ou en métabolites résultant de ces cultures, et notamment de cultures enrichies en bactéries nitrifiantes, ainsi qu'à un appareillage pour la mise en oeuvre dudit procédé. La présente invention est en outre relative à l'application dudit procédé à l'ensemencement de différents milieux biologiques (et notamment à l'ensemencement des bassins de nitrification) et pour la production de métabolites en solution concentrée.

Depuis de nombreuses années, les eaux superficielles et profondes voient leurs teneurs en azote augmenter de façon régulière et inquiétante, et ce phénomène pose d'énormes problèmes de pollution, tant dans le domaine des eaux usées que dans celui des eaux potables. Pour remédier à ce problème, il est indispensable d'assurer une bonne épuration des eaux usées urbaines et industrielles avant leur rejet dans les milieux récepteurs (cours d'eau, lacs, océans, etc ...). De même, avant leur introduction dans les réseaux d'eau potable, les eaux destinées à la consommation nécessitent souvent un traitement d'élimination (ou de transformation) de l'azote, pour respecter les normes relatives aux taux de composés azotés. Selon les normes européennes relatives aux eaux potables, le taux d'ammoniaque doit être inférieur à 0,5 mg/l, le taux de nitrites inférieur à 0,1 mg/l et le taux de nitrates inférieur à 50 mg/l.

Divers procédés d'élimination (ou de transformation) de l'azote sont utilisés, les plus courants et les moins onéreux étant les procédés biologiques. Ces procédés biologiques font appel à certains microorganismes, dont le rôle est de transformer l'azote présent dans les eaux sous forme d'ammoniaque, en nitrates dans une première étape appelée nitrification. Si la concentration en nitrates est trop élevée, la nitrification est suivie d'une seconde étape, la dénitrification, qui permet de transformer les nitrates en azote gazeux. La nitrification qui permet l'oxydation de

- 2 -

l'ammoniaque en nitrates se déroule en deux étapes. La première de ces étapes permet à l'ammoniaque d'être oxydé en nitrites : c'est la nitrification, alors qu'au cours de la deuxième étape, de nitratation, les nitrites sont oxydés en nitrates.

De nombreux microorganismes de la famille des Nitrobacteraceae sont capables de favoriser l'une ou l'autre de ces deux réactions, et les microorganismes les plus couramment rencontrés appartiennent aux genres Nitrosomonas pour la nitrification et Nitrobacter pour la nitratation. Or ces microorganismes sont très sensibles aux variations de leur environnement, en particulier à la qualité de l'effluent et à la concentration en composés azotés, allant jusqu'à provoquer leur disparition. En outre, les microorganismes ont un temps de doublement élevé. Le traitement des eaux contenant de l'azote ammoniacal pose ainsi de fréquents problèmes d'ensemencement ou de réensemencement des bassins de nitrification.

Il a donc été proposé d'ensemencer ou de réensemencer les bassins de traitement des eaux à l'aide de bactéries qui se développent naturellement (mais cette procédure est longue). Il a également été proposé de procéder à l'ensemencement par apport de boues activées provenant de nitrificateurs ou par apport de suspensions de diverses bactéries en vue d'améliorer le fonctionnement de ces installations, mais aucune de ces méthodes n'a conduit à des résultats satisfaisants.

Il est en conséquence du plus grand intérêt de pourvoir à un procédé de production en grandes quantités de bactéries nitrifiantes de la famille des Nitrobacteraceae, en vue d'ensemencer ou de réensemencer les bassins de nitrification, afin de pallier les problèmes rencontrés en nitrification biologique lors du traitement des eaux potables ou résiduaires à teneur en azote élevée.

La présente invention a pour objet un procédé de production de cultures enrichies en microorganismes et/ou en

- 3 -

métabolites résultant de ces cultures, caractérisé en ce que l'on cultive des souches de microorganismes sélectionnées, dans un bioréacteur approprié, en présence d'un substrat convenable dont la concentration est maintenue à des valeurs non inhibitrices de la croissance des bactéries, en ce que l'on élimine du milieu de culture les produits susceptibles d'inhiber les cellules, qui s'accumulent dans ledit milieu au cours de la fermentation, et en ce que l'on récupère les microorganismes et/ou les métabolites d'une manière appropriée.

Selon un mode de mise en oeuvre avantageux du procédé conforme à la présente invention, les cultures de microorganismes sont réalisées avec des souches de bactéries nitrifiantes de la famille des Nitrobacteraceae.

Selon une modalité avantageuse de cette disposition, les cultures de microorganismes nitrifiants mettent en oeuvre des bactéries nitrifiantes des genres Nitrosomonas, Nitrosospira, Nitrosolobus, Nitrosovibrio et Nitrosococcus.

Selon une autre modalité avantageuse de cette disposition, les cultures de microorganismes nitrifiants mettent en oeuvre des bactéries nitrifiantes des genres Nitrobacter, Nitrosococcus et Nitrospira.

Selon un mode de mise en oeuvre préféré du procédé conforme à la présente invention, la concentration optimale en substrat dans le milieu de culture est maintenue constante pendant toute la durée de la culture.

Selon une autre modalité avantageuse de ce mode de mise en oeuvre, la concentration en substrat est maintenue optimale en l'adaptant à la quantité de biomasse active présente.

Selon une disposition avantageuse du procédé conforme à l'invention, le contrôle de la concentration optimale du milieu en substrat est réalisé par dosage en continu du substrat, et ajout de substrat dans le milieu lorsque la concentration tombe au-dessous d'un seuil déterminé.

- 4 -

Selon un mode de mise en oeuvre avantageux du procédé conforme à l'invention, les produits inhibiteurs sont éliminés du milieu de culture par une technique de séparation appropriée, telle que, notamment, filtration ou centrifuga-

5 tion.

Selon une modalité avantageuse de ce mode de mise en oeuvre, le contrôle de la présence de produits inhibiteurs, et plus particulièrement des produits toxiques du métabolisme de la culture, est réalisé par dosage en continu et la séparation est déclenchée lorsque la concentration en les-

10

Selon une autre modalité avantageuse de mise en oeuvre du procédé conforme à l'invention, la culture comprend une pluralité d'étapes de fermentation successives qui consomment chacune une charge de substrat introduite au début de chacune d'elles avec une nouvelle charge de milieu de culture, dans la biomasse accumulée au cours des étapes successives de fermentation, et les étapes de fermentation successives sont séparées par des étapes d'élimination des produits inhibiteurs.

15

20

Selon encore une autre modalité avantageuse de mise en oeuvre du procédé conforme à l'invention, la culture est réalisée en présence de substrat dont la concentration est maintenue constante dans le milieu de culture par dosage en continu et ajout(s) de substrat dès la détection d'une concentration de substrat inférieure à un seuil prédéterminé, et les opérations de séparation sont déclenchées dès que la concentration en produits inhibiteurs, contrôlée par dosage en

25

30

Selon un mode de mise en oeuvre avantageux du procédé conforme à la présente invention, la culture est prélevée en discontinu.

Selon un autre mode de mise en oeuvre avantageux du procédé conforme à la présente invention, la culture est pré-

35

- 5 -

levée en continu.

Selon un mode de mise en oeuvre avantageux du procédé conforme à la présente invention, les cultures sont réalisées avec des souches du genre Nitrobacter.

5 Selon un autre mode de mise en oeuvre avantageux du procédé conforme à la présente invention, les cultures sont réalisées avec des souches du genre Nitrosomonas.

Selon encore un mode de mise en oeuvre avantageux du procédé conforme à la présente invention, on réalise des  
10 co-cultures de Nitrosomonas et de Nitrobacter.

Selon une modalité avantageuse de mise en oeuvre du procédé conforme à la présente invention, les produits toxiques du métabolisme des cultures de bactéries nitrifiantes sont éliminés lorsque leur concentration dans le milieu de  
15 culture atteint un seuil inhibiteur du métabolisme de ladite culture.

Selon un mode de mise en oeuvre avantageux du procédé conforme à la présente invention appliqué à la production de bactéries nitrifiantes, la concentration en substrat  
20 du milieu de culture des bactéries nitrifiantes, exprimée en azote, est avantageusement inférieure à 2 g/litre.

Selon un mode de mise en oeuvre avantageux du procédé conforme à la présente invention, les bactéries nitrifiantes recueillies en continu ou en discontinu sont soit  
25 utilisées immédiatement pour l'ensemencement des bassins de nitrification pour le traitement d'eaux polluées ou usées, soit conservées par congélation ou lyophilisation en vue d'une utilisation différée.

La présente invention a également pour objet un  
30 appareillage pour la production de cultures enrichies en microorganismes et/ou en métabolites résultant de ces cultures, caractérisé en ce qu'il comprend, en combinaison : - au moins un réacteur, pourvu de moyens de régulation de la température et du pH, de moyens d'alimentation contrôlée en air  
35 et de moyens d'agitation, lequel est en outre pourvu d'une

- 6 -

alimentation en milieu de culture et en substrat et d'une sortie des produits inhibiteurs et/ou des produits utiles du métabolisme des bactéries; - au moins un élément de séparation desdits produits associé à la sortie susdite; - un système de dosage en continu respectivement du substrat et des produits susdits; - un dispositif de commande, asservi au système de dosage en continu susdit, de l'introduction de quantités requises de substrat dans le, ou un, réacteur et de déclenchement du fonctionnement de l'élément, ou d'un élément, de séparation.

Selon un mode de réalisation avantageux de l'appareillage conforme à l'invention, l'élément de séparation est de préférence un élément d'ultra- ou de microfiltration.

Selon un autre mode de réalisation avantageux de l'appareillage conforme à l'invention, le système de dosage en continu comprend un circuit de prélèvement de faibles quantités du milieu contenu dans le réacteur, associé à des moyens de quantification en continu de la concentration en substrat et/ou en produits inhibiteurs.

Selon une disposition avantageuse de ce mode de réalisation, lesdits moyens de quantification sont constitués par des batteries de sondes calibrées qui émettent des signaux électriques.

Selon une autre disposition avantageuse de ce mode de réalisation, lesdits moyens de quantification sont constitués par au moins une chaîne de dosage colorimétrique physico-chimique.

Selon encore un autre mode de réalisation avantageux de l'appareillage conforme à l'invention, le dispositif de commande susdit est un dispositif pris dans le groupe des automates programmables et des ordinateurs ou micro-ordinateurs.

Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions, qui ressortiront de la description qui va suivre.

- 7 -

L'invention sera mieux comprise à l'aide du complément de description qui va suivre, qui se réfère au dessin annexé dans lequel : la figure unique du dessin annexé représente un schéma d'un mode de réalisation avantageux de l'appareillage conforme à la présente invention.

Il doit être bien entendu, toutefois, que ce dessin et les parties descriptives correspondantes sont donnés uniquement à titre d'illustration de l'objet de l'invention, dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.

L'appareillage conforme à la présente invention comprend avantageusement au moins un bioréacteur 1 dans lequel se déroule la culture du ou des microorganismes recherchée et dont le fonctionnement est commandé à partir d'une armoire de régulation 2 qui commande et contrôle l'alimentation en air, la température, l'agitation et le pH.

On introduit dans le bioréacteur 1 un volume de préculture égal par exemple à 10% du volume du bioréacteur, laquelle préculture a été réalisée en discontinu sur un milieu contenant une concentration initiale optimale en substrat (par exemple 200 mg d'azote/l dans le cas de la production de bactéries nitrifiantes à partir d'une souche de Nitrobacter Vinogradsky : sérotype agilis ou de Nitrosomonas sp.) et le bioréacteur est alimenté en milieu de culture à partir d'un réservoir 16 et en substrat à partir d'un réservoir 7'.

Le contrôle des concentrations en substrat et en produits inhibiteurs du métabolisme de la culture des microorganismes, dans le milieu de culture, est réalisé à l'aide des appareils décrits dans ce qui va suivre, de même que la commande, déterminée par le dosage desdites concentrations, de l'ajout de nouvelles quantités de substrat, du fonctionnement du système de séparation, notamment par filtration, des cultures de microorganismes produites et de collecte de celles-ci.

Une pompe de prélèvement 3 prélève une faible frac-



- 8 -

tion (de l'ordre de 0,1 à 0,5 ml/minute environ, par exemple) du milieu de culture contenu dans le bioréacteur 1 par l'intermédiaire d'un conduit 3' relié après la pompe 3 à un dispositif de dosage automatique en continu 4, tel qu'un appareil "Technicon" ou "Tecator" par exemple, ladite fraction prélevée étant éventuellement diluée avant son introduction dans le dispositif de dosage, dans un circuit de dilution 4'.

Les dosages du substrat et du produit du métabolisme du microorganisme contenus dans la fraction prélevée se font par colorimétrie ou par spectrophotométrie dans le dispositif de dosage 4 et on obtient en sortie dudit dispositif une réponse sous forme de signaux exprimés en tension, contrôlée par un voltmètre 5'. Les signaux (compris entre 0 et 5 Volts par exemple), qui correspondent aux valeurs de dosage, sont convertis par un convertisseur analogique numérique 5 en valeurs numériques, qui sont elles-mêmes traitées par un micro-ordinateur 6 afin de les exprimer en concentrations.

Ledit ordinateur commande d'une part une pompe d'alimentation 7 qui prélève une quantité déterminée de substrat contenu dans le réservoir 7' à l'aide d'une canalisation 7" reliée au bioréacteur 1, afin d'alimenter ce dernier en substrat.

Ledit ordinateur commande d'autre part la mise en route de l'opération de séparation, notamment par filtration, du milieu de culture contenu dans le bioréacteur 1 : avant de démarrer l'opération de filtration, une sonde de niveau 9 associée au bioréacteur vérifie que ce dernier n'est pas vide, puis la pompe de filtration 10, située entre le bioréacteur 1 et le module de filtration 12 se met en route. Ladite pompe prélève par l'intermédiaire d'un conduit 10' le milieu à filtrer contenu dans le bioréacteur 1, après ouverture d'une vanne 11 située entre le bioréacteur 1 et la pompe 10, et l'achemine dans le module de filtration 12 (qui est avantageusement constitué par exemple d'un filtre multifibres

- 9 -

en diacétate de cellulose). Le filtrat circule dans un conduit 13', après ouverture d'une vanne 13, et son débit, ainsi que le volume filtré, sont mesurés par un dispositif comprenant avantageusement un récipient de collecte du volume filtré 14, ce récipient reposant sur une balance 8, reliée par un transducteur 8' au micro-ordinateur 6. Une vanne supplémentaire 22 permet de vidanger le récipient de collecte 14. La partie non filtrée retourne dans le bioréacteur 1 par l'intermédiaire d'une canalisation 12'. La mesure du débit et du volume filtré peut être réalisée, selon une variante de réalisation, par un débitmètre en sortie de la vanne 13.

Selon une disposition avantageuse de l'invention, l'appareillage comprend un système qui permet, en cas de besoin, de décolmater le module de filtration 12. Du milieu de culture contenu dans un réservoir 18 est envoyé sous pression, après ouverture d'une vanne 19, au niveau bas du module de filtration 12; une partie dudit milieu traverse le module de filtration 12 entraînant avec elle les microorganismes adhérents au filtre pour retourner au bioréacteur 1 par le conduit 12'. Le remplissage du système de décolmatage est réalisé comme suit : une pompe de remplissage 15 prélève par un conduit 15' une fraction du milieu de culture contenu dans une enceinte de stockage 16, après ouverture d'une vanne 17, et envoie ledit milieu dans le réservoir 18 de milieu de décolmatage relié à un compresseur 18'. Le réservoir 18 est relié, selon une disposition avantageuse de l'invention, par un conduit 20' (après ouverture d'une vanne 20) à un récipient de trop-plein 21, ce système permettant de supprimer la pression dans le réservoir 18.

Le bioréacteur 1 est avantageusement alimenté en milieu de culture à partir de l'enceinte 16, à l'aide de la pompe 10 qui prélève ledit milieu par un conduit 23' après ouverture d'une vanne 23, l'achemine à travers le module de filtration 12, et le fait aboutir dans le bioréacteur 1 par le conduit 12'. En variante, l'alimentation du bioréacteur 1

- 10 -

en milieu de culture pourrait se faire directement à partir de l'enceinte de stockage 16 sans passer par le module de filtration 12.

L'appareillage comporte, selon une modalité avantageuse de l'invention, un système de prélèvement de la culture enrichie en microorganismes ou en métabolites résultant de cette culture, qui comprend une pompe 24 qui aspire ladite culture par un conduit 24' qui aboutit dans un récipient de stockage 25.

10 Un appareillage tel que décrit ci-dessus à titre d'exemple en référence au dessin, fonctionne de la manière suivante : le bioréacteur 1 est rempli de milieu de culture, d'une quantité déterminée de substrat et de précultures du ou des microorganismes destinées à ensemen-  
15 avoir réglé les conditions d'agitation, de température, d'alimentation en air et de pH à l'aide du système de régulation 2, la culture débute.

Une faible fraction, (de l'ordre de 0,1 à 0,5 ml/minute par exemple), du milieu de culture dans le bio-  
20 réacteur 1 est prélevée en continu par la pompe de prélèvement 3, et éventuellement diluée avant son introduction dans le dispositif de dosage en continu 4. Les valeurs de dosage du substrat et du produit, dosés par colorimétrie ou par spectrophotométrie dans ledit dispositif 4, sont émises sous  
25 forme de signaux de tension convertis en valeurs numériques par le convertisseur analogique numérique 5, ces dernières étant elles-mêmes traitées par le micro-ordinateur 6 et transformées en concentrations effectives. Si la concentration en substrat dans le bioréacteur 1 tombe au-dessous d'un  
30 seuil déterminé, ledit micro-ordinateur commande la pompe d'alimentation 7 afin d'alimenter le bioréacteur 1 en une quantité appropriée de substrat. Si la concentration en produit dans le bioréacteur 1 dépasse un seuil déterminé, ledit micro-ordinateur commande le déclenchement de l'opération de  
35 filtration.

- 11 -

Le milieu à filtrer est prélevé du bioréacteur 1 par une pompe de filtration 10, après qu'une sonde de niveau 9 ait vérifié que le bioréacteur n'est pas vide, puis ce milieu est envoyé dans un module de filtration 12. Le filtrat  
5 est recueilli dans un récipient de collecte 14 qui repose sur une balance 8 reliée au micro-ordinateur 6 par un transducteur 8' qui lui transmet successivement les valeurs des pesées obtenues, le contrôle de la pesée du liquide filtré permettant ainsi de suivre le débit de filtration instantané et  
10 de contrôler le volume filtré. Suivant l'indication numérique donnée par la balance 8 et transmise au micro-ordinateur par le transducteur 8', la filtration est arrêtée ou poursuivie.

Lorsque le débit de filtration devient trop faible en fin d'opération, il est procédé à une opération de décolmatage du module de filtration 12. Du milieu de culture contenu dans un réservoir 18 est envoyé, sous une pression créée par un compresseur 18' associé au réservoir 18, à grande vitesse au niveau bas du module de filtration 12 et le décolmatage du module de filtration 12 s'effectue ainsi par flux  
15 inverse du milieu de culture; une partie du milieu traverse le module de filtration 12 pour retourner au bioréacteur 1 comme indiqué plus haut. Une pompe de remplissage 15 prélève ensuite du milieu de culture contenu dans une enceinte de stockage 16, et l'envoie dans le réservoir 18 de milieu de  
20 décolmatage.  
25

Une fois réalisée l'opération de filtration, le bioréacteur 1 est rempli de milieu de culture, à l'aide de la pompe 10 qui prélève ledit milieu du réservoir 16 en le faisant passer à travers le module de filtration 12 réalisant  
30 ainsi un nettoyage supplémentaire du module de filtration et le fait aboutir dans le bioréacteur 1. Enfin, un système de prélèvement en permet selon une disposition avantageuse, grâce à une pompe 24, de recueillir les cultures enrichies en microorganismes ou en métabolites résultant de ces cultures.

35 L'invention sera mieux comprise à l'aide du complé-

- 12 -

ment de description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de mise en oeuvre du procédé de production de cultures enrichies en microorganismes et/ou en métabolites résultant de ces cultures conforme à la présente invention.

- 5 Il doit être bien entendu, toutefois, que ces exemples sont donnés uniquement à titre d'illustration de l'objet de l'invention, dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.

EXEMPLE 1 : PRODUCTION DU MICROORGANISME NITROBACTER

- 10 - Le genre Nitrobacter regroupe des bactéries de 0,8 à 2 µm de long, immobiles de manière générale. Ces bactéries, aérobies, sont chimolithotrophes et utilisent pour leur croissance le carbone inorganique dissous dans le milieu. Cette bactérie est responsable de la transformation des
- 15 nitrites en nitrates, suivant la réaction :  $\text{NO}_2^- + 1/2 \text{O}_2 \rightarrow \text{NO}_3^-$ , qui est la nitratisation, deuxième étape de la nitrification biologique. La souche utilisée a été isolée à partir du nitrificateur d'eau potable de la station d'Aubergenville.

- 20 La souche est susceptible d'être inhibée par son substrat ( $\text{NO}_2^-$ ) et par son produit ( $\text{NO}_3^-$ ).

- Conditions de culture

1. Un milieu de culture adapté à la production du micro-organisme Nitrobacter est un milieu minéral tampon répondant à la formulation suivante :

|    |  |        |
|----|--|--------|
| 25 | $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 12 $\text{H}_2\text{O}$  | 12,6 g |
|    | $\text{KH}_2\text{PO}_4$   | 0,5 g  |
|    | Solution A   | 1 ml   |
|    | ( $\text{ZnSO}_4$ , 7 $\text{H}_2\text{O}$ : 2 mg; $\text{CuSO}_4$ , 5 $\text{H}_2\text{O}$ : 2 mg |        |
| 30 | $\text{Na}_2\text{MoO}_4$ , 2 $\text{H}_2\text{O}$ : 2 mg; QSP 100 ml)                             |        |
|    | Solution B   | 10 ml  |
|    | ( $\text{MgSO}_4$ , 7 $\text{H}_2\text{O}$ : 2 g; QSP 100ml)                                       |        |
|    | Solution C   | 5 ml   |
|    | ( $\text{FeSO}_4$ , 7 $\text{H}_2\text{O}$ : 114 mg; EDTA : 206 mg;                                |        |
| 35 | QSP 1 litre)   |        |

- 13 -

2. Conditions de régulation, assurées par le dispositif constituant l'armoire de contrôle du bioréacteur dont le volume utile est de 4 litres (le bioréacteur utilisé est de marque "BIOLAFFITTE") :

5      Température                      30°C  
      Alimentation en air 0,5 v.v.m (litres d'air /mn/litre de réacteur)  
      Agitation                        300 tours/mn.

10      3. Ensemencement : les cultures sontensemencées à 10% avec des précultures effectuées en discontinu sur le milieu défini précédemment, additionné de 203 mg d'azote par litre.

     4. Source d'azote                 $\text{NaNO}_2$   
      Source de carbone               $\text{CO}_2$  dissous  
      15      Source d'oxygène                 $\text{O}_2$  dissous  
      Source d'énergie                énergie de la réaction  $\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}_3^-$ .

- Mise en oeuvre du procédé pour une culture en discontinu à concentration de substrat constante avec filtrations

20      On utilise un bioréacteur "Biolafitte" de volume utile égal à 4 litres qu'on remplit du milieu minéral tampon décrit plus haut, additionné d'une quantité initiale de substrat telle que la concentration en azote initiale  $S_0$  de substrat dans le bioréacteur est fixée à  $203 \pm 40$  mg/l. Les nitrites et les nitrates sont dosés en continu par une chaîne de dosage colorimétrique physicochimique ("Technicon" par exemple). Les signaux (0 à 5 volts) en sortie des colorimètres sont convertis en valeurs numériques traitées par un micro-ordinateur ("Apple", par exemple) afin de les ramener à des concentrations. Si la concentration en substrat, exprimée  
      25      en azote, est inférieure à la valeur  $S_0 - 20\%$  (soit une concentration en azote d'environ 162 mg/l), valeur appelée X, il y a déclenchement d'un ajout de substrat dont la quantité est déterminée de la manière suivante : quantité de l'ajout en substrat =  $2 \times (S_0 - X)$ , de façon à dépasser  
      30      d'autant la valeur moyenne nécessaire. La solution de subs-  
      35

- 14 -

tratt utilisée est une solution de  $\text{NaNO}_2$  concentrée (30,45 g d'azote/l). Les filtrations sont déclenchées lorsque la concentration en nitrates (produit) dépasse une concentration exprimée en azote fixée à 812 mg/l (au-delà de 1,22 g d'azote/l on observe une baisse conjointe de la croissance et de l'activité).

Une séquence de filtration entièrement automatisées se déroule suivant le processus suivant :

- Vérification du volume de milieu de culture dans le bioréacteur ( $\geq 4,5$  litres),
- Déclenchement de la filtration,
- Estimation de la quantité de filtrat passée ( $\geq 4$  litres)
- Arrêt de la filtration,
- Décolmatage par flux inverse de milieu minéral tampon (pression : 2 à 3 bars, durée : 15 secondes),
- Remplissage du bioréacteur avec du milieu minéral tampon à travers le module de filtration et remplissage du circuit de décolmatage,
- Ajout du substrat pour obtenir une concentration  $S_0$ , puis on procède au redémarrage de la fermentation.

**EXEMPLE 2 : AUGMENTATION DE LA CONCENTRATION EN BIOMASSE DANS LE BIOREACTEUR SUIVANT DIFFERENTES METHODES (POUR LE MICROORGANISME NITROBACTER)**

**- Culture en discontinu simple**

Le milieu minéral tampon décrit à l'Exemple 1 est introduit dans le bioréacteur dans lequel on a placé 10% de précultures effectuées en discontinu sur le milieu précité, additionné de 203 mg d'azote/litre. La culture est menée jusqu'à complète consommation du substrat par le micro-organisme.

Résultats : au bout de 100 heures, on obtient 13 mg/l de biomasse.

**- Culture en discontinu alimentée**

Le milieu minéral tampon décrit dans l'Exemple 1 contenu dans le bioréacteur estensemencé à raison de 10% par des

- 15 -

précultures comme indiqué précédemment, additionné de 203 mg d'azote/l et la culture consiste en une succession de fermentations : dès que la complète consommation du substrat par le microorganisme est détectée, on ajoute du substrat dans le bioréacteur. L'inhibition par les nitrates produits bloque la réaction après 16 ajouts de substrat, qui correspondent à une concentration finale de 4,7 g d'azote/l.

Résultats : on obtient au bout de 460 heures, 85 mg/l de biomasse.

- Culture en discontinu avec filtrations

Le milieu minéral tampon décrit dans l'Exemple 1, additionné de 203 mg d'azote/l, est introduit dans le bioréacteur qui contient une souche de bactériesensemencée par des précultures, comme indiqué plus haut. La culture consiste en une succession de fermentations simples séparées par des filtrations : dès que la consommation complète du substrat par le microorganisme est détectée, on filtre le contenu du bioréacteur. La biomasse est conservée dans l'enceinte du bioréacteur et le filtrat est rejeté à l'égout. On complète le niveau du bioréacteur par du milieu minéral tampon additionné d'azote en quantité variable.

Résultats : au bout de 2 600 heures, on obtient 250 mg/l de biomasse.

- Culture en discontinu à concentration de substrat constante

Le bioréacteur est alimenté en milieu minéral tampon décrit dans l'Exemple 1 et en microorganismesensemencés par des précultures comme décrit plus haut. La concentration en substrat dans le bioréacteur est fixée à  $203 \pm 40$  mg d'azote/l. Les nitrites et les nitrates sont dosés en continu, comme dans l'Exemple 1, par une chaîne de dosage colorimétrique physico-chimique ("Technicon" par exemple) et l'ajout d'une quantité déterminée de substrat est automatiquement déclenché quand la concentration en nitrites tombe en dessous d'une valeur limite déterminée.



- 16 -

On constate que la croissance s'arrête au bout de 100 heures, pour 220 mg/l de biomasse obtenu lorsque la concentration en azote atteint 1,01 g/litre, et au bout de 145 heures, pour 260 mg/l de biomasse obtenu, lorsque la concentration en azote atteint 1,78 g/l.

5

- Culture en discontinu à concentration de substrat constante avec filtrations

On reprend la même procédure que celle décrite dans l'Exemple 1 et les filtrations sont déclenchées lorsque la concentration en azote dépasse 812 mg/l.

10

Résultats : au bout de 500 heures, on obtient 3 000 mg/l de biomasse,  
au bout de 620 heures, on obtient 3 900 mg/l de biomasse.

15

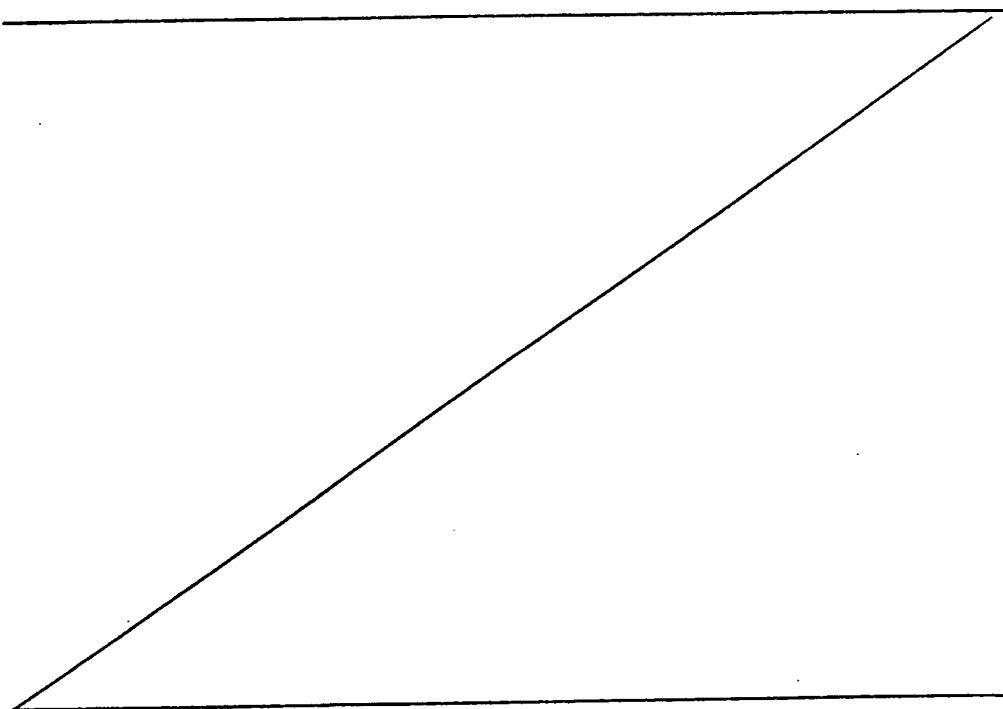
Les résultats obtenus avec ces différentes méthodes sont consignés dans le Tableau 1 ci-dessous.

20

25

30

35



- 17 -

TABLEAU I

|    | METHODE<br>EMPLOYEE   | DUREE<br>(h) | BIOMASSE<br>(mg/l) | FACTEUR DE<br>CONCENTRA-<br>TION (*) | CONCENTRA-<br>TION/UNITE<br>DE TEMPS(*) |
|----|---|--------------|--------------------|--------------------------------------|---|
| 5  | Culture en<br>1 discontinu  | 100          | 13                 | 1                                    | 1                                       |
| 10 | Culture en<br>2 discontinu<br>alimentée                               | 460          | 85                 | 6,5                                  | 1,4                                     |
| 15 | Culture en dis-<br>3 continu avec<br>filtrations                      | 2 600        | 250                | 19                                   | 0,7                                     |
| 20 | Culture en<br>4 discontinu à<br>substrat constant                     | 100<br>145   | 220<br>260         | 17<br>20                             | 17,0<br>13,8                            |
| 25 | Culture en<br>discontinu à<br>5 substrat constant<br>avec filtrations | 500<br>620   | 3 000<br>3 900     | 230<br>300                           | 46,0<br>48,4                            |

(\*) la référence en concentration de biomasse et unité de temps correspond à la méthode 1

Le Tableau ci-dessus montre la supériorité du procédé conforme à l'invention pour l'obtention de quantités importantes de microorganismes dans un réacteur de faible volume et dans un temps relativement bref.

- 18 -

**EXEMPLE 3 : PRODUCTION DE CO-CULTURES DE NITROSOMONAS ET DE NITROBACTER**

Le milieu de culture mis en oeuvre est le milieu décrit à l'Exemple 1, additionné d'ions  $\text{NH}_4^+$  sous forme de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  
5 etensemencé avec une coculture de Nitrobacter et de Nitrosomonas. Les bactéries Nitrosomonas présentes dans la culture transforment l'ammoniaque en nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ), qui est le substrat de la bactérie Nitrobacter, et dont la concentration, exprimée en azote, doit être maintenue inférieure à  
10 200 mg/litre environ.

Les chaînes de dosage colorimétriques dosent dans cet Exemple le  $\text{NO}_2^-$  qui est à la fois le produit de Nitrosomonas et le substrat de Nitrobacter, et le produit ( $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ , exprimé en  $\text{NO}_x^-$ ).

15 On obtient après 1 200 h, 1 g/l de biomasse.

Les bactéries autotrophes responsables de la nitrification (Nitrosomonas et Nitrobacter) obtenues en grandes quantités conformément à la présente invention sont utilisées soit immédiatement, soit en différé (après congélation et  
20 lyophilisation), pour ensemenecer ou réensemencer les bassins de nitrification pour le traitement des eaux usées ou polluées, avec les avantages suivants :

- amélioration du rapport investissement/production,
- simplification des phases de transport,
- 25 - diminution des volumes à traiter pour la conservation des cultures par congélation ou lyophilisation,
- diminution des volumes à stocker,
- réduction des volumes à mettre en oeuvre lors des ensemencements.

30 Le procédé conforme à la présente invention peut également s'appliquer à d'autres souches que celles des bactéries nitrifiantes, dans le but d'ensemencer d'autres systèmes (démarrage des unités de fermentation à l'échelle industrielle avec un volume de préculture 300 fois inférieur à celui requis conformément à l'Art antérieur).

35

- 19 -

**EXEMPLE 4 : PRODUCTION DE METABOLITES**

Le procédé de la présente invention peut également être utilisé pour la production par des microorganismes, de métabolites en solution concentrée dans le but de simplifier les étapes de purification du produit formé (stérilisation par filtration, solution concentrée, production accélérée étant donnée la quantité de microorganismes présents dans le bioréacteur; exemples : acide acétique, polysaccharides, vitamine B<sub>12</sub> ...).

- 10 - Cas d'une production de métabolite interne à la bactérie  
On utilise la bactérie *Propionibacterium acidipropionis* sur un milieu dont la concentration en sucres (exemple le glucose) est de 40 g/l, la production de biomasse étant limitée par la production d'acide propionique ou acétique.
- 15 Cette fermentation se produit avec une succession de périodes aérobies-anaérobies. Le déclenchement de la filtration se fait lorsque la concentration d'acide propionique dépasse 20 g/l. Cette bactérie accumule de la vitamine B<sub>12</sub> à une concentration d'environ 100 µg/g de cellule, qui est
- 20 extraite après lyse des cellules et purifiée par chromatographie. Les résultats obtenus avec l'appareillage conforme à la présente invention sont supérieurs à 110 g/l de biomasse (en culture alimentée classique, on obtient 15 g/l de biomasse).
- 25 - Cas d'une production externe de métabolites associée à la culture de bactéries  
On peut par exemple faire produire des nitrites par la bactérie *Nitrosomonas*, des nitrates par la bactérie *Nitrobacter*, ou de l'acide propionique par la bactérie *Propionibacterium acidipropionis*.
- 30

Ainsi que cela ressort de ce qui précède, l'invention ne se limite nullement à ceux de ses modes de mise en oeuvre, de réalisation et d'application qui viennent d'être décrits de façon plus explicite; elle en embrasse au contraire toutes les variantes qui peuvent venir à l'esprit du technicien en la matière, sans s'écarter du cadre, ni de la portée, de la présente invention.

35

- 20 -

REVENDICATIONS

1°) Procédé de production de cultures enrichies en microorganismes et/ou en métabolites résultant de ces cultures, caractérisé en ce que l'on cultive des souches de micro-  
5 organismes sélectionnées, dans un bioréacteur approprié, en présence d'un substrat convenable dont la concentration est maintenue à des valeurs non inhibitrices de la croissance des bactéries, en ce que l'on élimine du milieu de culture les  
10 produits susceptibles d'inhiber les cellules, qui s'accumulent dans ledit milieu au cours de la fermentation, et en ce que l'on récupère les microorganismes et/ou les métabolites d'une manière appropriée.

2°) Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que les cultures de microorganismes sont réalisées avec  
15 des souches de bactéries nitrifiantes de la famille des Nitrobacteraceae.

3°) Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que les cultures de microorganismes mettent en oeuvre des bactéries nitrifiantes des genres Nitrosomonas, Nitrospira,  
20 Nitrosolobus, Nitrosovibrio et Nitrosococcus.

4°) Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que les cultures de microorganismes mettent en oeuvre des bactéries nitrifiantes des genres Nitrobacter, Nitrosococcus et Nitrospira.

25 5°) Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la concentration optimale en substrat dans le milieu de culture est maintenue constante pendant toute la durée de la culture.

6°) Procédé selon la revendication 1, caractérisé  
30 en ce que la concentration en substrat est maintenue optimale en l'adaptant à la quantité de biomasse active présente.

7°) Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le contrôle de la concentration optimale du milieu en substrat est réalisé par dosage en continu du substrat, et  
35 ajout de substrat dans le milieu lorsque la concentration

- 21 -

tombe au-dessous d'un seuil déterminé.

8°) Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que les produits inhibiteurs sont éliminés du milieu de culture par une technique de séparation appropriée, telle  
5 que, notamment, filtration ou centrifugation.

9°) Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce que le contrôle de la présence de produits inhibiteurs, et plus particulièrement des produits toxiques du métabolisme de la culture, est réalisé par dosage en continu et la sépa-  
10 ration est déclenchée lorsque la concentration en lesdits produit dans le milieu de culture atteint un taux prédéter-  
miné.

10°) Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la culture comprend une pluralité d'étapes de fer-  
15 mentation successives qui consomment chacune une charge de substrat introduite au début de chacune d'elles avec une nou-  
velle charge de milieu de culture, dans la biomasse accumulée au cours des étapes successives de fermentation, et les éta-  
pes de fermentation successives sont séparées par des étapes  
20 d'élimination des produits inhibiteurs.

11°) Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la culture est réalisée en présence de substrat dont la concentration est maintenue constante dans le milieu de culture par dosage en continu et ajout(s) de substrat dès  
25 la détection d'une concentration de substrat inférieure à un seuil prédéterminé, et les opérations de séparation sont dé-  
clenchées dès que la concentration en produits inhibiteurs, contrôlée par dosage en continu, atteint un seuil prédéter-  
miné.

30 12°) Procédé selon l'une quelconque des revendica-  
tions 1 à 11, caractérisé en ce que la culture est prélevée en discontinu.

13°) Procédé selon l'une quelconque des revendica-  
tions 1 à 11, caractérisé en ce que la culture est prélevée  
35 en continu.

- 22 -

14°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 13, caractérisé en ce que les cultures sont réalisées avec des souches du genre Nitrobacter.

5 15°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 13, caractérisé en ce que les cultures sont réalisées avec des souches du genre Nitrosomonas.

16°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 13, caractérisé en ce que l'on réalise des co-cultures de Nitrosomonas et de Nitrobacter.

10 17°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 16, caractérisé en ce que les produits toxiques du métabolisme des cultures de bactéries nitrifiantes sont éliminés lorsque leur concentration dans le milieu de culture atteint un seuil inhibiteur du métabolisme de ladite culture.

15 18°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 17, caractérisé en ce que la concentration en substrat du milieu de culture des bactéries nitrifiantes, exprimée en azote, est avantageusement inférieure à 2 g/litre.

20 19°) Application des bactéries nitrifiantes produites par le procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 18, à l'ensemencement ou au réensemencement de bassins de nitrification.

25 20°) Application des bactéries nitrifiantes produites par le procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 18, après conservation par congélation ou lyophilisation, à l'ensemencement ou au réensemencement de bassins de nitrification.

30 21°) Appareillage pour la production de cultures enrichies en microorganismes et/ou en métabolites résultant de ces cultures, caractérisé en ce qu'il comprend, en combinaison : - au moins un réacteur, pourvu de moyens de régulation de la température et du pH, de moyens d'alimentation contrôlée en air et de moyens d'agitation, lequel est en outre pourvu d'une alimentation en milieu de culture et en  
35 substrat et d'une sortie des produits inhibiteurs et/ou des

- 23 -

produits utiles du métabolisme des bactéries; - au moins un élément de séparation desdits produits associé à la sortie susdite; - un système de dosage en continu respectivement du substrat et des produits susdits; - un dispositif de commande, asservi au système de dosage en continu susdit, de l'introduction de quantités requises de substrat dans le, ou un, réacteur et de déclenchement du fonctionnement de l'élément, ou d'un élément, de séparation.

22\*) Appareillage selon la revendication 21, caractérisé en ce que l'élément de séparation est de préférence un élément d'ultra- ou de microfiltration.

23\*) Appareillage selon la revendication 21, caractérisé en ce que le système de dosage en continu comprend un circuit de prélèvement de faibles quantités du milieu contenu dans le réacteur, associé à des moyens de quantification en continu de la concentration en substrat et/ou en produits inhibiteurs.

24\*) Appareillage selon la revendication 23, caractérisé en ce que les moyens de quantification sont constitués par des batteries de sondes calibrées qui émettent des signaux électriques.

25\*) Appareillage selon la revendication 23, caractérisé en ce que les moyens de quantification sont constitués par au moins une chaîne de dosage colorimétrique physico-chimique.

26\*) Appareillage selon l'une quelconque des revendications 21 à 25, caractérisé en ce que le dispositif de commande est un dispositif pris dans le groupe des automates programmables et des ordinateurs ou micro-ordinateurs.



